

Kinetin/Auxin Ratio and Development of Chloroplasts in Tissue Cultures of *Daucus carota*

In a previous article¹ we have shown that tissue cultures of *Daucus carota* on synthetic medium maintain their white colour in the presence of the hormone 2,4-dichloro-phenoxy-acetic acid (2,4-D). Electron microscopy studies have shown that, under these experimental conditions, the development of chloroplasts is arrested at the stage of 'initials of proplastids'. On the other hand, chloroplasts are formed in the presence of kinetin (K) and indole-3-acetic acid (IAA)¹. Our data agree with those obtained by LAETSCH and STETLER² on a strain of *Nicotiana tabacum* in the presence of naphthalene-acetic acid and kinetin. At this stage there are 2 possible explanations about the development of chloroplasts: either there is an inhibiting effect of the auxins, or a stimulating effect of kinetin. Unfortunately, it is not possible to grow callus cultures in the presence of kinetin alone, since the only cultures which can grow in the absence of auxins are the 'cultures anergiées'³. These cultures cannot, however, be used for our purpose, since they are believed to produce endogenous auxins.

We have therefore studied the development of explants of *Daucus carota* in the presence of different amounts of kinetin and auxins. Callus cultures obtained from the root of *Daucus carota* have been subcultured for a 2-year period on White's medium⁴ supplemented by 2,4-D (0.1 mg/l). Callus fragments have been grown in continuous light on MURASHIGE and SKOOG⁵ medium or LINSMAIER and SKOOG⁶ medium. The amount of kinetin in these media varies from 0–5 mg/l. The amount of auxin, when in the form of 2,4-D varies from 0.1–1 mg/l, and in the form IAA from 0.1–5 mg/l.

Callus fragments, weighing 300–400 mg, have been transplanted on fresh medium every 10th day, and have been weighed after 30 days of culture. On the same day, the amount of green pigment present in each culture has been evaluated by comparison of the intensity of colour of different fragments. (It is not possible to quantify these findings, since the distribution of pigmentation is not homogeneous throughout the callus.) Figure 1 shows the percentage of weight increase and amount of green pigment present in samples grown on MURASHIGE and SKOOG⁵ medium (MS) in the presence of different amounts

of K and IAA. Figure 2 shows the percentage of weight increase and the amount of pigmentation in samples grown on MS in the presence of different concentrations of K and 2,4-D. Figure 3 refers to the results obtained on explants grown on LINSMAIER and SKOOG⁶ medium (LS) in the presence of K and IAA.

¹ G. ARANCIA, M. BANDIERA and G. MORPURGO, *Annali Ist. sup. Sanità* 3, 175 (1967).

² W. M. LAETSCH and D. A. STETLER, in *Le Chloroplaste* (Ed. C. SIRONVAL; Masson et Cie, Paris 1967), p. 291.

³ R. J. GAUTHERET, *C. r. Séanc. Soc. Biol.* 256, 2071 (1963).

⁴ P. R. WHITE, in *The Cultivation of Animal and Plant Cells* (Ronald Press Co., New York 1963), p. 288.

⁵ T. MURASHIGE and F. SKOOG, *Physiologia Pl.* 15, 473 (1962).

⁶ E. M. LINSMAIER and F. SKOOG, *Physiologia Pl.* 18, 100 (1965).

2-4D \ K	0	01	1	5
01	280	400	650	230
1	300	350	480	270

Fig. 2. Percentage of weight increase of *Daucus carota* callus samples grown on MS medium in the presence of K and 2,4-D (mg/l). The closer the distance between the lines, the more intense the green colour of samples.

IAA \ K	0	01	1	5
01	370	460	570	370
1	300	510	570	270
5	390	480	570	250

Fig. 1. Percentage of weight increase of *Daucus carota* callus samples grown on MS medium in the presence of K and IAA (mg/l). The closer the distance between the lines, the more intense the green colour of samples.

IAA \ K	0	01	1	5
01	230	150	330	250
1	220	300	580	150
5	230	290	530	180

Fig. 3. Percentage of weight increase of *Daucus carota* callus samples grown on LS medium in the presence of K and IAA (mg/l). The closer the distance between the lines, the more intense the green colour of the samples.

Under these 3 different experimental conditions the amount of pigment seems to be related to the ratio kinetin/auxin; more specifically, chloroplasts differentiation is enhanced by high relative concentration of K, while it is independent of the absolute amount of auxin and kinetin. Cultures grown on LS medium show a higher rate of pigmentation. This medium, however, does not influence the effect of the hormonal ratio between kinetin and auxin. Figure 4 shows the increase in weight

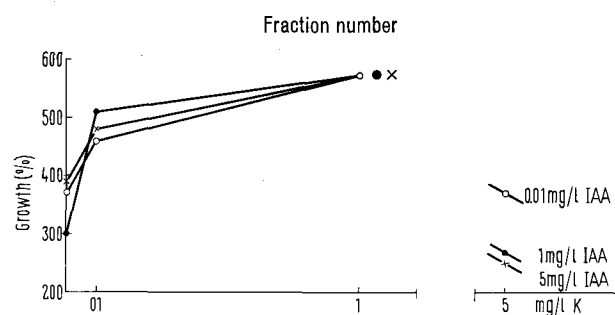


Fig. 4. Increase in weight of the explants grown on MS medium in the presence of different amounts of K and IAA.

of the explants grown in the presence of K and IAA on MS. This graph clearly shows that, in the range of hormone concentrations which have been used, the increase in weight is strictly dependent on the amount of K present and independent of the amount of auxine⁷.

Riassunto. Nell'intento di stabilire i fattori responsabili del differenziamento dei cloroplasti in culture di tessuto di *Daucus carota*, sono stati eseguiti esperimenti al fine di scegliere tra le 3 ipotesi possibili: la chinetina stimola la formazione dei cloroplasti; le auxine inibiscono la formazione dei cloroplasti; il differenziamento dei cloroplasti dipende dal rapporto chinetina/auxina, indipendentemente dalla quantità assoluta dei 2 ormoni. Si dimostra che quest'ultima ipotesi è corretta.

M. BANDIERA and G. MORPURGO

Centro di Genetica Evolutiva del CNR,
Istituto di Genetica, Università di Roma,
I-00185 Roma (Italy), 24 November 1969.

⁷ The technical help of G. CONTI is gratefully acknowledged.

PRO EXPERIMENTIS

Nouveaux résultats à propos de l'histologie nerveuse chez les Invertébrés

Tout récemment, le technique de fixation-coloration de MAILLET nous donna de nouveaux résultats. Ceux-ci ont permis de vérifier l'hypothèse que nous formulions auparavant en vue de préconiser son utilisation dans les travaux d'histologie du système nerveux périphérique chez les Invertébrés. Grâce à cette méthode, nous¹ avons pu décrire diverses structures nerveuses au niveau des palpes labiaux d'*Anodonta* (Mollusque Lamellibranche). Entretemps, MAILLET et al.^{2,3} publièrent des études critiques concernant l'utilisation et les limites de cette technique. Ils tentèrent d'en expliquer la portée histo-chimique grâce à l'ultramicroscopie. Malgré les interprétations récentes soulevées par WIENKER⁴, EBNER et NIEBAUER⁵, PELLEGRINO DE IRALDI et GUEUDET⁶,... cette dernière question reste controversée.

Nous avons aussi utilisé la technique de MAILLET chez les Arthropodes. Une coloration convenable du tissu nerveux paraît très difficile à obtenir dans ce matériel zoologique. Nos essais démontreraient l'importance du revêtement chitineux qui constituerait par sa structure et sa nature, une sorte de «barrière» vis-à-vis des propriétés particulières de coloration propre au mélange osmié.

Chez *Daphnia pulex* (Crustacé Cladocère), nous avons obtenu des résultats intéressants uniquement et seulement après avoir endommagé ou décapité les animaux d'expérience. Des fibres nerveuses variqueuses imprégnées par le MAILLET peuvent être observées dans le protocérébrum et la commissure œsophagienne. Un groupe ventral de 4 cellules neuro-sécrétrices est mis en évidence. Le deutocérébrum possède une affinité particulière pour le mélange fixateur. En périphérie, une fibre musculaire est

enserrée par une terminaison nerveuse (Figure 1). L'intestin montre un réseau dense d'éléments osmiophiles et nerveux (Figure 2). Simultanément, des animaux intacts, utilisés comme témoins, furent fixés dans des conditions identiques. Les préparations microscopiques indiquèrent une bonne conservation des tissus fixés, mais aucun élément nerveux n'a pu être mis en évidence.

Chez *Tenebrio molitor* (Insecte Coléoptère), seuls les organes disséqués et extirpés ont donné de bons résultats; ainsi la Figure 3 montre de fines terminaisons variqueuses autour des fibres musculaires du proventricule.

Au cours de nos investigations visant à inventorier les groupes zoologiques auxquels la technique de MAILLET pourrait être utilisée, nous nous sommes attachés à plusieurs embranchements: les Cœlentérés, les Annélides, les Mollusques et les Arthropodes. Chez les Cœlentérés (Hydraires, Siphonophores, Automéduses), la technique ne nous donna aucun résultat intéressant. Jusqu'à présent, les Annélides et les Mollusques nous ont révélé les meilleurs résultats par la régularité et la finesse de coloration des éléments nerveux.

¹ J. GILLOTEAUX, *Annls. Soc. R. Zool. Belg.* 98, 101 (1968).

² M. MAILLET, *C. r. Ass. Anat.*, Paris 140, 233 (1968).

³ CH. CLARA, CL. DAVID et M. MAILLET, *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 79, 292 (1968).

⁴ M. G. WIENKER, *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 76, 70 (1967).

⁵ H. VON EBNER et G. NIEBAUER, *Mikroskopie* 22, 299 (1967).

⁶ A. PELLEGRINO DE IRALDI et R. GUEUDET, *Z. Zellforsch.* 91, 178 (1968).